

6. Ergebnisse

6.1. Epigallocatechin-3-Gallat

6.1.1. Entwicklung der Transplantate

Nach Isolierung und Transplantation in die Rückenhautkammer wiesen die Endometriumfragmente und ovariellen Follikel in beiden Beobachtungsgruppen eine vergleichbare Größe von ca. 0,25mm² auf. Am Tag 14 lag die Endgröße der Transplantate, bezogen auf die am Tag 0 gemessene Größe, bei 109% ± 13% (bei den Endometriumfragmenten) und bei 107% ± 6% (bei den ovariellen Follikeln). Dies war im Vergleich zu der in der Kontrollgruppe beobachteten Größenentwicklung nicht signifikant unterschiedlich (142% ± 19% bei den Endometriumfragmenten und 139% ± 9% bei den ovariellen Follikeln).

6.1.2. Mikrovaskuläres Netzwerk

In den sich entwickelnden Endometrioseherden der EGCG-behandelten Hamster und der Kontrollgruppe konnten schon am 2. Tag nach der Transplantation durchblutete Kapillaren nachgewiesen werden. Während der folgenden Tage bildete sich eine vermehrte Zahl von Kapillaren innerhalb der Herde in beiden Gruppen aus. Dies resultierte in einer vaskularisierten Fläche von 90-100% am Tag 14 (*Abbildung 7A, B und Abbildung 8A*). Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Tiere der EGCG-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch eine signifikant reduzierte Kapillardichte auf (*Abbildung 7A, B und Abbildung 8B*). Im Gegensatz dazu wurde die Vaskularisierung transplantiert ovarieller Follikel durch die Behandlung mit EGCG nicht beeinflusst. Erste Anzeichen von Gefäßneubildung, d.h. die Ausbildung von Kapillarsprossen, konnte in den Follikeln am 2. Tag nach der Transplantation beobachtet werden (*Abbildung 8C*). Anschließend entwickelten sich sowohl in der EGCG-Gruppe als auch in der Kontrollgruppe neue mikrovaskuläre Netzwerke innerhalb der Follikel. Diese wiesen eine vaskularisierte Fläche von 100% und eine Kapillardichte von ca. 300cm/cm² an Tag 10 und 14 nach Transplantation auf (*Abbildung 7C, D und Abbildung 8C, D*).

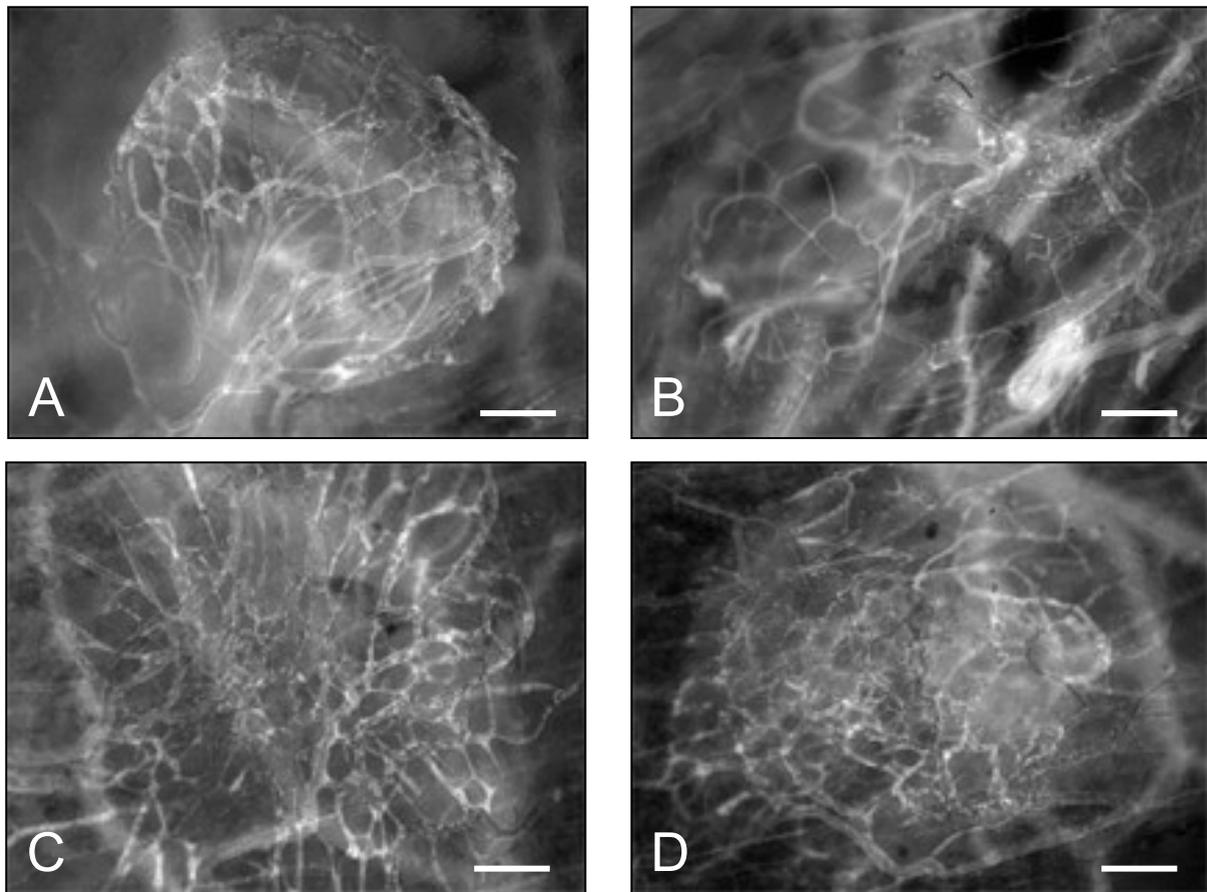


Abbildung 7: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie von Endometrioseherden (**A, B**) und ovariellen Follikeln (**C, D**) am Tag 10 nach Gewebetransplantation in die Rückenhautkammer von EGCG-behandelten Hamstern (**B, D**) und Kontrollhamstern (**A, C**). Sowohl die Endometrioseherde als auch die ovariellen Follikel weisen vollständige, neu entwickelte mikrovaskuläre Netzwerke mit einer glomerulären Gefäßarchitektur auf. Jedoch sind die Endometrioseherde der EGCG-Gruppe durch eine sichtbar reduzierte Kapillardichte gekennzeichnet (**B**). Blau-Licht Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung durch 5% FITC-Dextran. Maßstab: A-D = 160 μ m.

6.1.3. Mikrohämodynamik

Während des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen lagen die Durchmesser der Kapillaren in den Endometrioseherden zwischen 10 und 14 μ m und in den ovariellen Follikeln zwischen 9 und 12 μ m. Innerhalb der beiden Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied (*Tabelle 2*).

In der Kontrollgruppe kam es im Laufe des Versuchs in den Gefäßen der Endometrioseherde zu einem stetigen Anstieg der Blutzellgeschwindigkeit und des Blutvolumenflusses bis zu Maximalwerten von 234 μ m/s und 21pl/s an Tag 10 (*Tabelle 2*). Interessanterweise reduzierte die Behandlung mit EGCG deutlich die Blutperfusion innerhalb der Herde, was sich in einer verringerten Fließgeschwindigkeit von

nur 135µm/s und einem verringerten Blutvolumenfluss von 14µl/s an Tag 10 zeigte (*Tabelle 2*).

Im Gegensatz dazu beeinflusste die Behandlung mit EGCG die Blutperfusion ovarieller Follikel nicht, die eine vergleichbare Blutzellgeschwindigkeit und einen entsprechenden Blutvolumenfluss in beiden Gruppen während des gesamten Beobachtungszeitraums aufwiesen (*Tabelle 2*).

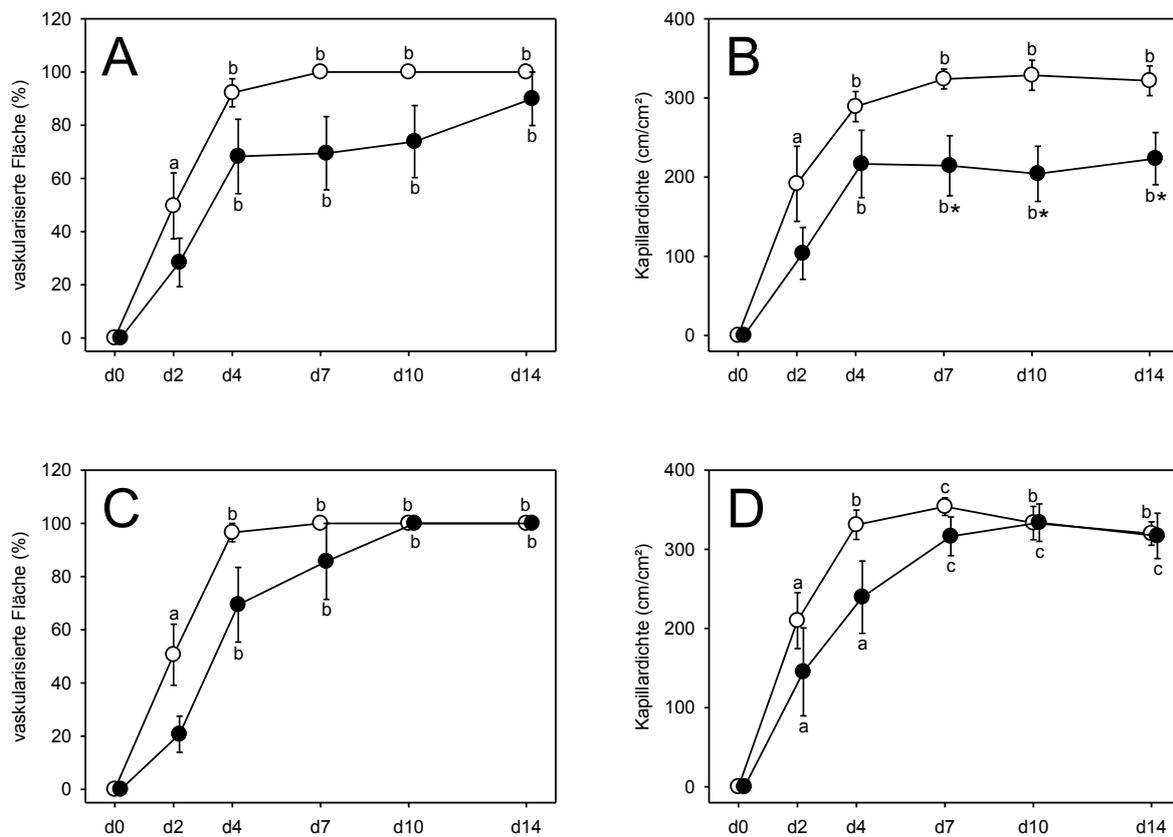


Abbildung 8: Vaskularisierte Fläche (%) (A, C) und Kapillardichte (cm/cm²) (B, D) von Endometrioseherden (A, B) und ovariellen Follikeln (C, D) in der Rückenhautkammer von EGCG-behandelten Hamstern (schwarze Kreise; n=7) und Kontrollhamstern (weiße Kreise; n=10). Mittelwerte \pm SEM. ^aP<0,05 vs. Tag 0 innerhalb einer Gruppe; ^bP<0,05 vs. Tag 0 und 2 innerhalb einer Gruppe; ^cP<0,05 vs. Tag 0, 2 und 4 innerhalb einer Gruppe; *P<0,05 vs. Kontrollgruppe.

Endometrium	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Gefäßdurchmesser					
EGCG	12,5 ± 0,7	11,7 ± 1,2	12,2 ± 1,0	13,0 ± 1,3	10,4 ± 0,7
Kontrolle	13,0 ± 0,7	14,1 ± 1,2	12,0 ± 1,0	11,7 ± 0,6	11,2 ± 0,6
Blutzellgeschwindigkeit					
EGCG	24,1 ± 7,2	94,5 ± 11,9 ^a	132,8 ± 30,4 ^{a*}	135,3 ± 25,1 ^{a*}	106,9 ± 25,3 ^{a*}
Kontrolle	39,3 ± 15,3	129,0 ± 32,5 ^a	229,8 ± 17,7 ^b	233,9 ± 24,3 ^b	213,4 ± 28,2 ^b
Blutvolumenfluss					
EGCG	2,3 ± 0,7	9,4 ± 2,3	11,7 ± 3,7 [*]	14,2 ± 3,3	6,8 ± 1,6 [*]
Kontrolle	3,5 ± 1,0	13,9 ± 2,4 ^a	19,5 ± 3,9 ^a	21,1 ± 4,9 ^b	16,6 ± 2,1 ^a
Follikel	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Gefäßdurchmesser					
EGCG	12,4 ± 0,9	10,3 ± 0,6	9,5 ± 0,5	9,6 ± 0,6	10,1 ± 0,6
Kontrolle	11,6 ± 0,7	9,9 ± 0,3	9,5 ± 0,2 ^a	11,7 ± 0,6 ^b	9,8 ± 0,3
Blutzellgeschwindigkeit					
EGCG	7,2 ± 5,2	111,1 ± 11,9 ^a	212,1 ± 30,0 ^b	187,3 ± 35,1 ^b	211,7 ± 45,4 ^b
Follikel	17,0 ± 9,9	120,5 ± 21,8 ^a	242,8 ± 26,5 ^b	258,5 ± 17,3 ^b	205,6 ± 15,5 ^b
Blutvolumenfluss					
EGCG	0,6 ± 0,4	6,5 ± 1,8 ^a	11,9 ± 2,4 ^a	10,4 ± 3,3 ^a	13,0 ± 2,1 ^a
Kontrolle	1,1 ± 0,6	6,0 ± 1,3 ^a	13,7 ± 1,6 ^b	12,5 ± 1,5 ^b	11,4 ± 0,9 ^b

Tabelle 2: Gefäßdurchmesser (μm), Blutzellgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) und Blutvolumenfluss (pl/s) der Gefäße in Endometriumfragmenten und ovariellen Follikeln in der Rückenhautkammer von EGCG-behandelten Hamstern und Kontrollhamstern. Mittelwerte \pm SEM. ^a $P < 0,05$ vs. Tag 2 innerhalb einer Gruppe; ^b $P < 0,05$ vs. Tag 2 und 4 innerhalb einer Gruppe; ^{*} $P < 0,05$ vs. Kontrollgruppe.

6.1.4. Histologie

Die histologische Analyse der Rückenhautkammerpräparate am Tag 14 zeigte, dass sich die transplantierten Endometriumfragmente zu Endometrioseherden mit typischer Histomorphologie [Laschke et al., 2005; 2006a; 2006b] entwickelten. So wiesen die Herde zystenähnlich dilatierte Drüsen auf, die von vaskularisiertem Stroma umgeben waren (Abbildung 9A, B). Die Behandlung mit EGCG führte dagegen zu einer Regression der Endometrioseherde. Dies war im Vergleich zur Kontrollgruppe sichtbar an einem erniedrigtem Drüsenepithel, einer verminderten Kapillardichte und einer signifikant verminderten Läsionsgröße (Abbildung 9B, E). Eine detaillierte Analyse der Zysten- und Stromagröße innerhalb dieser Herde ließ eine signifikante Gewebereduktion des Stromaanteils erkennen, während die Größe der Zysten durch die Behandlung mit EGCG unbeeinflusst blieb (Abbildung 9E). Entsprechend der intravitalmikroskopischen Ergebnisse konnten bei der histologischen Analyse der transplantierten Follikel keine Unterschiede zwischen EGCG-Hamstern und Kontrollhamstern gefunden werden. In beiden Gruppen waren die ovariellen Follikel dicht vaskularisiert und von vergleichbarer Größe (Abbildung 9C, D und F).

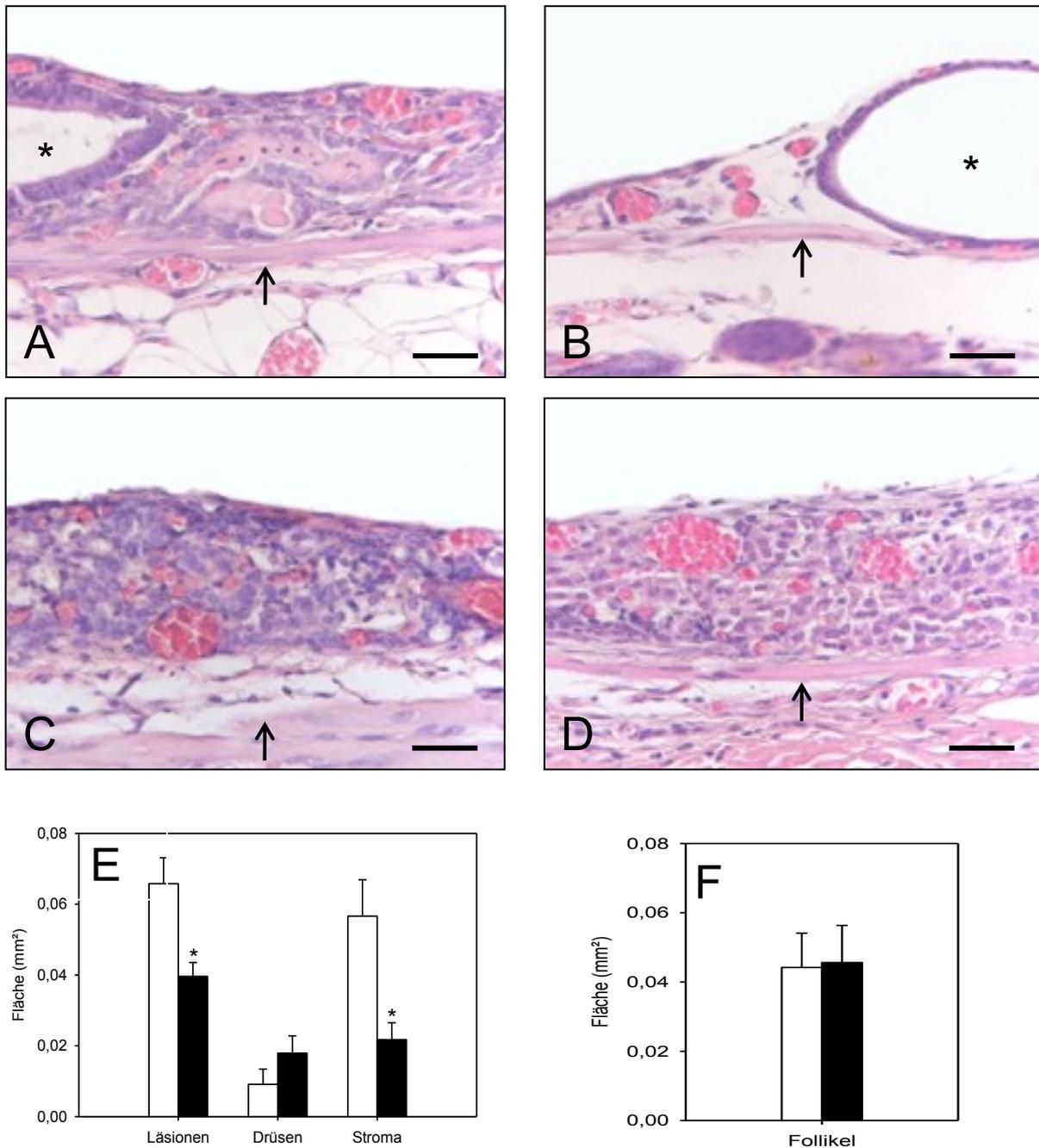


Abbildung 9: Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Schnitte von Endometrioseherden (A, B) und ovariellen Follikeln (C, D) am Tag 14 nach Gewebetransplantation auf die quergestreifte Muskulatur (Pfeile) der Rückenhautkammer von EGCG-behandelten Hamstern (B, D) und Kontrollhamstern (A, C). In beiden Gruppen zeichnen sich die Endometrioseherde durch zystenähnlich dilatierte endometriale Drüsen (Sternchen), die von einem vaskularisierten endometrialen Stroma umgeben sind, aus (A, B). Jedoch resultiert die Behandlung mit EGCG in einer Regression der Endometrioseherde (B), sichtbar an einem abgeflachten Drüsenepithel, einer verminderten Kapillardichte und einer reduzierten Läsionsgröße, im Vergleich zur Kontrollgruppe (A). Im Gegensatz dazu sind die ovariellen Follikel beider Gruppen dicht vaskularisiert und weisen eine vergleichbare Größe auf (C, D). Maßstab: A-D = 50µm. (E, F) Fläche (mm²) von Endometrioseherden, endometrialen Drüsen, endometrialem Stroma und ovariellen Follikeln in der Rückenhautkammer von EGCG-behandelten Hamstern (schwarze Balken; n=7) und Kontrollhamstern (weiße Balken; n=10). Mittelwerte ± SEM. *P<0,05 vs. Kontrollgruppe.

6.1.5. Western Blot und WST-1-Assay endometrialer Zellen

Die Aktivität EGCG-exponierter endometrialer Stromazellen (ESCs) zeigte im WST-1-Assay keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (*Abbildung 10A*). Die Stimulierung der ESCs mit E2 resultierte in einem signifikanten Anstieg der metabolischen Aktivität der Zellen, die wiederum nicht durch zusätzliche Behandlung mit EGCG inhibiert werden konnte (*Abbildung 10A*). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei unstimulierten endometrialen Drüsenzellen (EGCs) gefunden. Bei Exposition mit EGCG unterschieden sie sich nicht von der Kontrollgruppe (*Abbildung 10B*). Die Stimulation mit E2 führte zu einem signifikanten Anstieg der Aktivierung der EGCs. Interessanterweise konnte diese Aktivierung im Gegensatz zu den ESCs durch Behandlung mit EGCG reduziert werden (*Abbildung 10B*). Dieses Ergebnis zeigt, dass EGCG die E2-induzierte Aktivierung der EGCs effektiv hemmt.

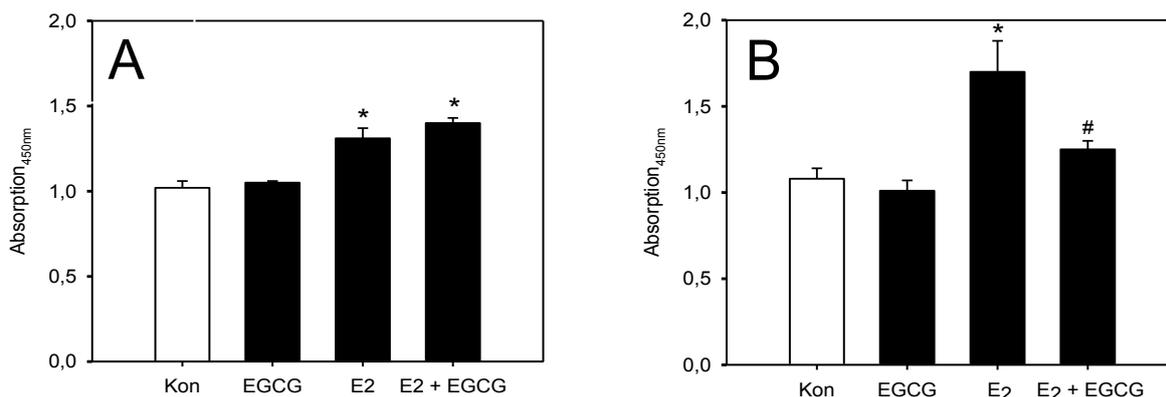


Abbildung 10: Analyse der Zellaktivität von endometrialen Stromazellen (ESCs) (A) und endometrialen Drüsenzellen (EGCs) (B) mittels WST-1-Assay. Die Zellen wurden in Anwesenheit von EGCG (n=4), 17 β -Östradiol (E2; n=4) oder einer Kombination aus beiden (EGCG+E2; n=4) kultiviert. Zellen, die dem Vehikel ausgesetzt waren, dienten als Kontrolle (Kon; n=4). Mittelwerte \pm SEM. *P<0,05 vs. Kontrollgruppe und EGCG; #P< 0,05 vs. E2.

Die Western Blot Analyse kultivierter ESCs und EGCs zeigte, dass eine EGCG-Behandlung die Proteinexpression von PCNA und VEGF in unstimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht beeinflusst (*Abbildung 11*). Die Stimulation mit E2 führte zu einem signifikanten Anstieg der PCNA- und VEGF-Expression, der am ausgeprägtesten in den EGCs war. Gemäß den Ergebnissen des WST-1-Assays konnte diese E2-induzierte Aktivierung der Zellen durch EGCG-Exposition wiederum unterdrückt werden (*Abbildung 11*).

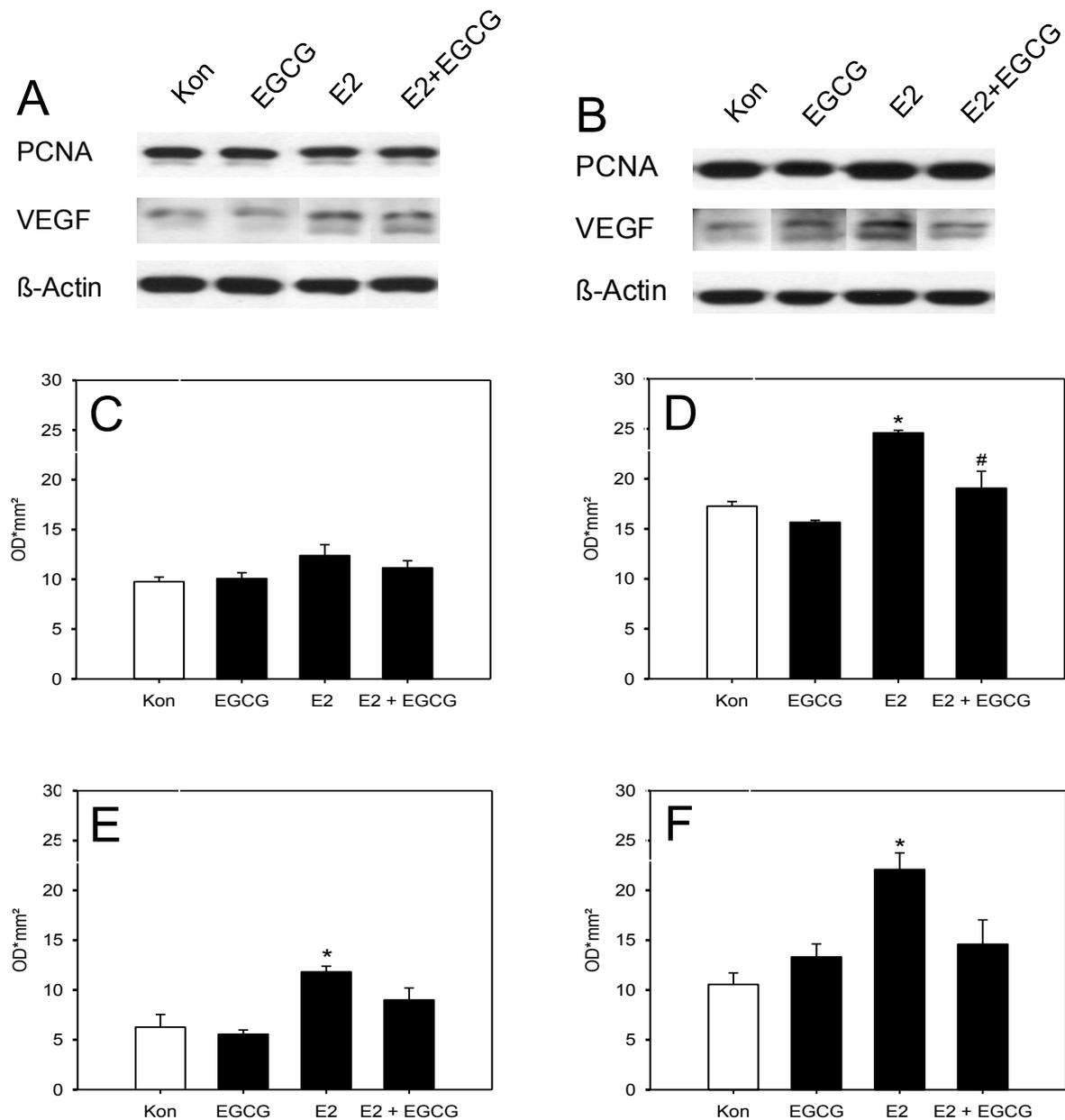


Abbildung 11: Western Blot (A, B) und Quantifizierung der PCNA- (C, D) und VEGF-Expression (E, F) (Isoformen 189 und 165) (optische Dichte (OD)*mm²) in kultivierten endometrialen Stromazellen (ESCs) (A, C und E) und endometrialen Drüsenzellen (EGCs) (B, D und F). Die Zellen wurden in Anwesenheit von EGCG (n=3), E2 (n=3) oder einer Kombination aus beiden kultiviert (EGCG+E2; n=3). Zellen, die dem Vehikel ausgesetzt waren, dienten als Kontrolle (Kon; n=3). Mittelwerte \pm SEM. *P<0,05 vs. Kontrollgruppe und EGCG, #P<0,05 vs. E2.

6.1.6. Western Blot von eutopem Endometrium und Ovar

Die Western Blot Analyse von eutopem Endometrium und Ovar ergab, dass die EGCG-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe die Proteinexpression von PCNA nicht beeinflusste. Allerdings war die VEGF-Expression im eutopen Endometrium der EGCG-behandelten Hamster signifikant vermindert, wohingegen beim Ovar keine Unterschiede feststellbar waren (Abbildung 12).

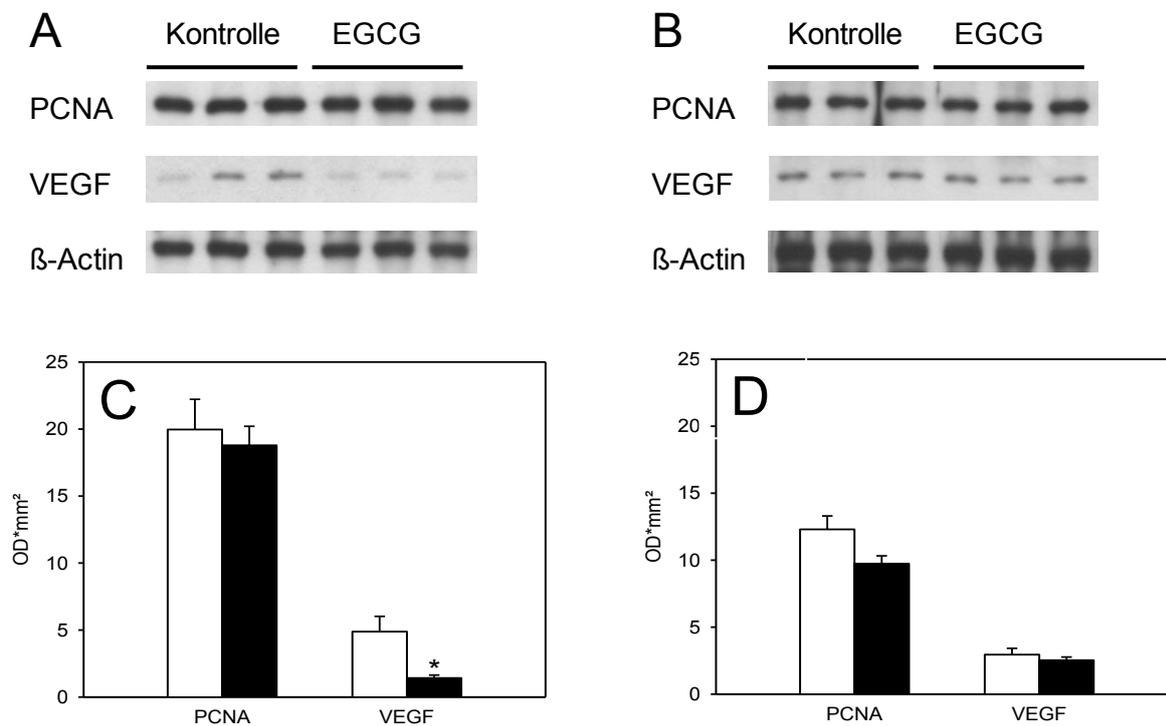


Abbildung 12: Western Blot (A, B) und Quantifizierung der PCNA- und VEGF-Expression (Isoform 189) (C, D) (OD*mm²) in eutopem Endometrium (A, C) und Ovarien (B, D) von EGCG-behandelten Hamstern (schwarze Balken; n=3) und Kontrollhamstern (weiße Balken; n=3). Mittelwerte \pm SEM. *P<0,05 vs. Kontrollgruppe.

6.2. Glycin

6.2.1. Entwicklung der Transplantate

Nach Isolierung und Transplantation in die Rückenhautkammer wiesen die Endometriumfragmente und ovariellen Follikel in beiden Untersuchungsgruppen eine vergleichbare Größe von ca. 0,5-0,6mm² auf. Die Behandlung mit Glycin führte zu keiner Regression der Endometriumfragmente und ovariellen Follikel. Diese hatten an Tag 14, bezogen auf die am Tag 0 gemessene Größe, eine Endgröße von 83% ± 14% (Endometriumfragmente) und 99% ± 11% (ovarielle Follikel). Dies war nicht signifikant unterschiedlich zu der in der Kontrollgruppe beobachteten Größe (101% ± 20% bei den Endometriumfragmenten und 129% ± 22% bei den ovariellen Follikeln).

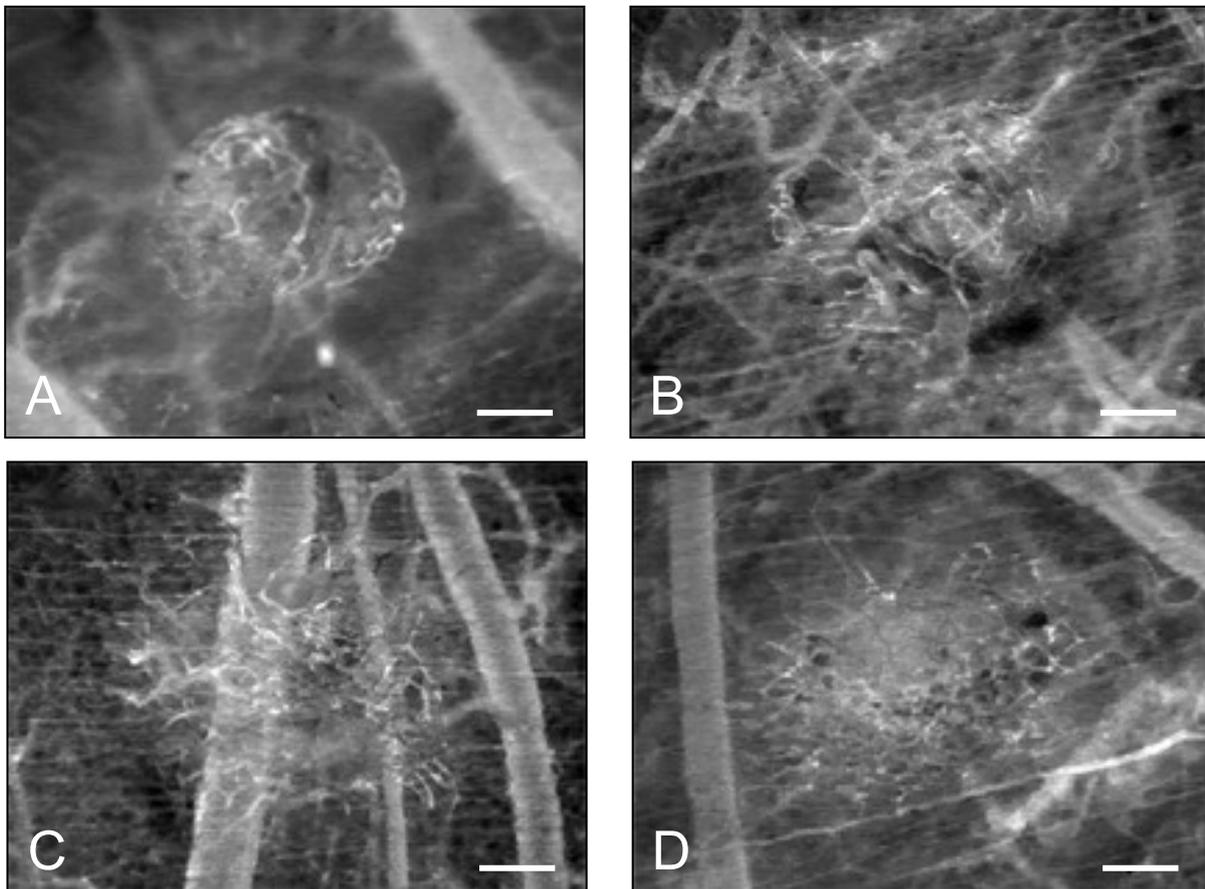


Abbildung 13: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie von Endometrioseherden (A, B) und ovariellen Follikeln (C, D) am Tag 10 nach Gewebetransplantation in die Rückenhautkammer von Glycin-behandelten Hamstern (B, D) und Kontrollhamstern (A, C). Alle Transplantate weisen vollständige, neu entwickelte mikrovaskuläre Netzwerke mit einer glomerulumartigen Gefäßarchitektur auf. Blau-Licht Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung durch 5% FITC-Dextran. Maßstab: A-D = 280µm.

6.2.2. Mikrovaskuläres Netzwerk

Die Entwicklung neuer Blutgefäße in Endometrioseherden und ovariellen Follikeln wurde durch die Glycin-Diät nicht beeinträchtigt. Erste Zeichen einer Gefäßneubildung innerhalb der Transplantate konnten am 2. Tag nach Transplantation in die Rückenhautkammer beobachtet werden (*Abbildung 13 und Abbildung 14*). Die Größe der Gefäßnetzwerke in den Endometriumfragmenten und ovariellen Follikeln nahmen im Beobachtungszeitraum stetig zu. Bis zum 10. Tag wiesen die Transplantate schließlich vollständige mikrovaskuläre Netzwerke auf. Diese hatten eine Kapillardichte von 200-300cm/cm² ohne signifikante Unterschiede zwischen Glycin-behandelten Hamstern und Kontrollhamstern (*Abbildung 13 und Abbildung 14*).

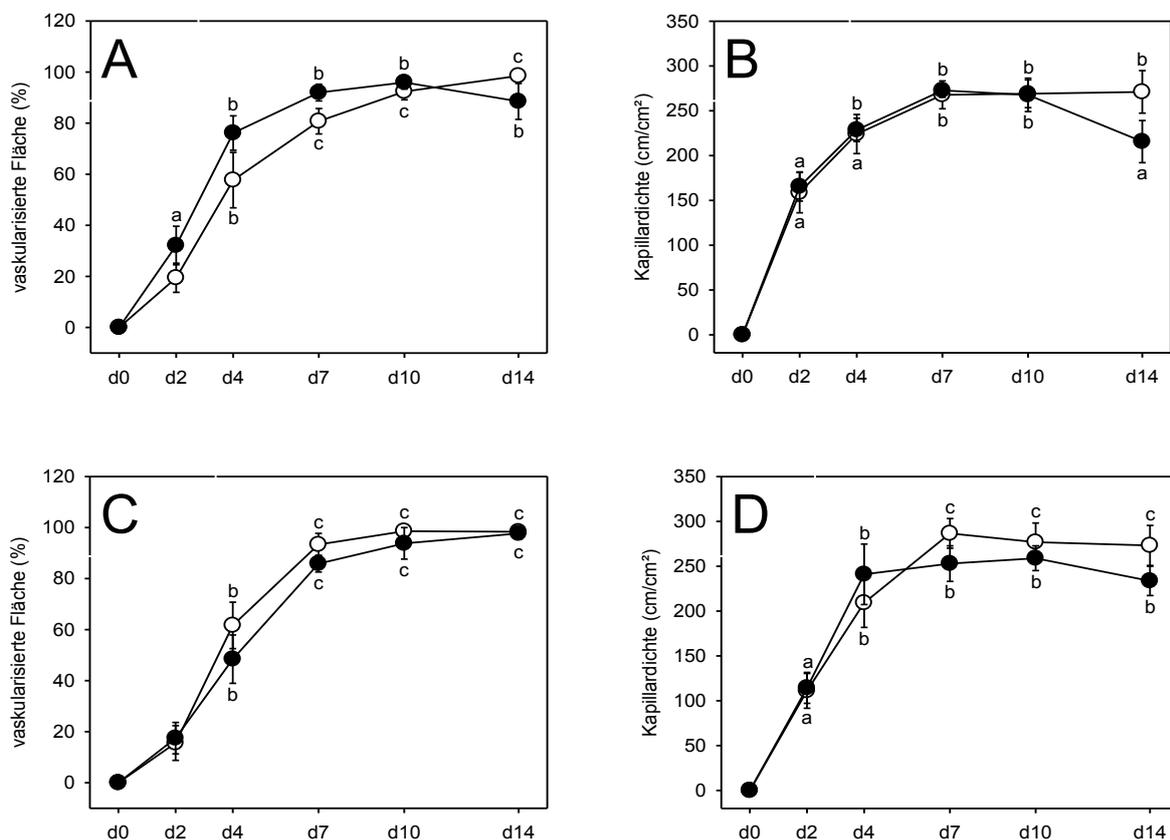


Abbildung 14: Vaskularisierte Fläche (%) (**A**, **C**) und Kapillardichte (cm/cm²) (**B**, **D**) von Endometrioseherden (**A**, **B**) und ovariellen Follikeln (**C**, **D**) in der Rückenhautkammer Glycin-behandelter Hamster (schwarze Kreise; n=8) und Kontrollhamster (weiße Kreise; n=8). Mittelwerte \pm SEM. ^aP<0,05 vs. Tag 0 innerhalb einer Gruppe; ^bP<0,05 vs. Tag 0 und 2 innerhalb einer Gruppe; ^cP<0,05 vs. Tag 0, 2 und 4 innerhalb einer Gruppe; *P<0,05 vs. Kontrollgruppe.

6.2.3. Mikrohämodynamik

Ab dem 2. Tag nach Transplantation in die Rückenhautkammer waren bei Endometrioseherden und ovariellen Follikeln Kapillarsprossen sichtbar, welche aus dem umgebenden Kammergewebe in die Transplantate einwuchsen. Diese unreifen Blutgefäße waren durch große Gefäßdurchmesser (16-21µm), eine niedrige Blutzellgeschwindigkeit (5-14 µm/s), und einen geringen Blutvolumenfluss (1-4pl/s) gekennzeichnet (*Tabelle 3*). Am Tag 14 hatten sich die Durchmesser der neu gebildeten Blutgefäße auf 9-12µm reduziert. Die Blutzellgeschwindigkeit und der Blutvolumenfluss waren auf 200-300µm/s bzw. 13-19pl/s angestiegen (*Tabelle 3*).

Endometrium	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Gefäßdurchmesser					
Glycin	20,4 ± 2,4	15,3 ± 1,6 ^a	13,3 ± 0,3 ^a	11,7 ± 0,6 ^a	10,6 ± 0,3 ^a
Kontrolle	16,4 ± 2,4	16,0 ± 1,4	13,3 ± 0,6	11,5 ± 0,6 ^b	11,6 ± 0,2 ^b
Blutzellgeschwindigkeit					
Glycin	14,3 ± 2,9	95,3 ± 19,9	127,1 ± 14,2 ^a	201,5 ± 25,4 ^b	268,3 ± 55,8 ^c
Kontrolle	13,2 ± 4,3	95,4 ± 42,4	168,1 ± 26,9 ^a	185,4 ± 40,3 ^a	216,9 ± 23,4 ^a
Blutvolumenfluss					
Glycin	4,3 ± 1,3	11,6 ± 1,6	13,4 ± 1,4 ^a	15,8 ± 1,4 ^a	18,5 ± 4,2 ^a
Kontrolle	3,0 ± 1,4	11,5 ± 4,4	18,6 ± 3,7 ^a	18,1 ± 6,6	17,0 ± 2,8 ^a
Follikel	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Gefäßdurchmesser					
Glycin	20,9 ± 3,7	14,1 ± 0,8	12,1 ± 0,5	10,1 ± 0,4 ^a	9,7 ± 0,5 ^a
Kontrolle	17,4 ± 1,2	13,5 ± 0,7 ^a	11,4 ± 0,7 ^a	11,0 ± 0,5 ^b	9,8 ± 0,4 ^b
Blutzellgeschwindigkeit					
Glycin	5,2 ± 3,1	119,2 ± 33,8 ^a	161,4 ± 32,3 ^a	220,2 ± 40,4 ^b	214,4 ± 32,3 ^b
Kontrolle	13,7 ± 3,0	80,2 ± 27,3	214,8 ± 49,7 ^b	288,9 ± 56,3 ^b	311,8 ± 43,9
Blutvolumenfluss					
Glycin	1,4 ± 0,7	13,4 ± 2,5 ^a	14,1 ± 2,7 ^a	12,9 ± 1,9 ^a	12,9 ± 2,1 ^a
Kontrolle	2,8 ± 0,5	9,6 ± 4,2	19,1 ± 5,7 ^a	21,0 ± 4,2 ^a	18,7 ± 3,6 ^a

Tabelle 3: Gefäßdurchmesser (µm), Blutzellgeschwindigkeit (µm/s) und Blutvolumenfluss (pl/s) der Kapillaren in Endometrioseherden und ovariellen Follikeln in der Rückenhautkammer Glycin-behandelter Hamster und Kontrollhamster. Mittelwerte ± SEM. ^aP<0,05 vs. Tag 2 innerhalb einer Gruppe; ^bP>0,05 vs. Tag 2 und 4 innerhalb einer Gruppe. ^cP<0,05 vs. Tag 2, 4 und 7 innerhalb einer Gruppe.

6.2.4. Histologie und Immunhistochemie

Die histologische Analyse der Rückenhautkammerpräparate am Tag 14 ergab, dass die transplantierten Endometriumfragmente sich zu Endometrioseherden mit typischer Histomorphologie [Laschke et al., 2005; Laschke et al., 2006a; 2006b] entwickelt hatten. Die Herde wiesen zystenähnlich dilatierte Drüsen auf, die von einem vaskularisierten Stroma umgeben waren (*Abbildung 15A, B*). Die transplantierten ovariellen Follikel beider Gruppen waren durch mehrere, die Eizelle umgebende,

Schichten von Granulosazellen und eine gut entwickelte, vaskularisierte Theca interna gekennzeichnet (Abbildung 15B, C). Die Glycin-Diät beeinflusste im Vergleich zur Kontrollgruppe weder die Histomorphologie der Endometrioseherde noch der ovariellen Follikel. Zusätzlich dazu war die Zahl atretischer Follikel in eutopen Ovarien von Glycin- und Kontrollhamstern vergleichbar (Abbildung 16).

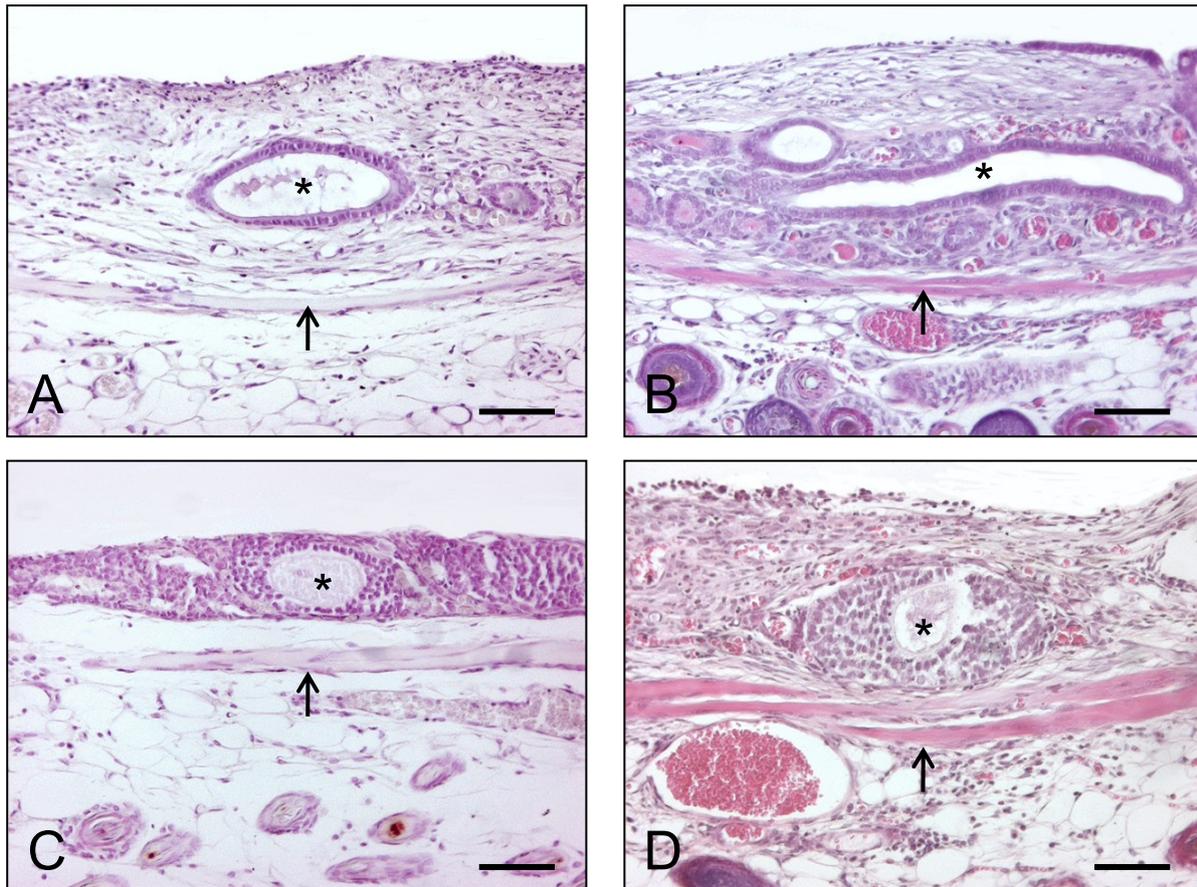


Abbildung 15: Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte von Endometrioseherden (A, B) und ovariellen Follikeln (C, D) am Tag 14 nach Gewebetransplantation auf die quergestreifte Muskulatur (Pfeile) der Rückenhautkammer Glycin-behandelter Hamster (B, D) und Kontrollhamster (A, C). In beiden Gruppen zeichnen sich die Endometrioseherde durch zystenähnlich dilatierte endometriale Drüsen (Sternchen) mit intaktem Drüsenepithel aus, das von einem vaskularisierten endometrialen Stroma (A, B) umgeben ist. Die transplantierten ovariellen Follikel beider Gruppen sind durch mehrere Schichten von Granulosazellen charakterisiert, die die Eizelle umgeben (Sternchen), sowie durch eine gut vaskularisierte Theca-Interna-Zellschicht, was das Stadium später Sekundärfollikel widerspiegelt (C, D). Maßstab: A-D = 120µm.

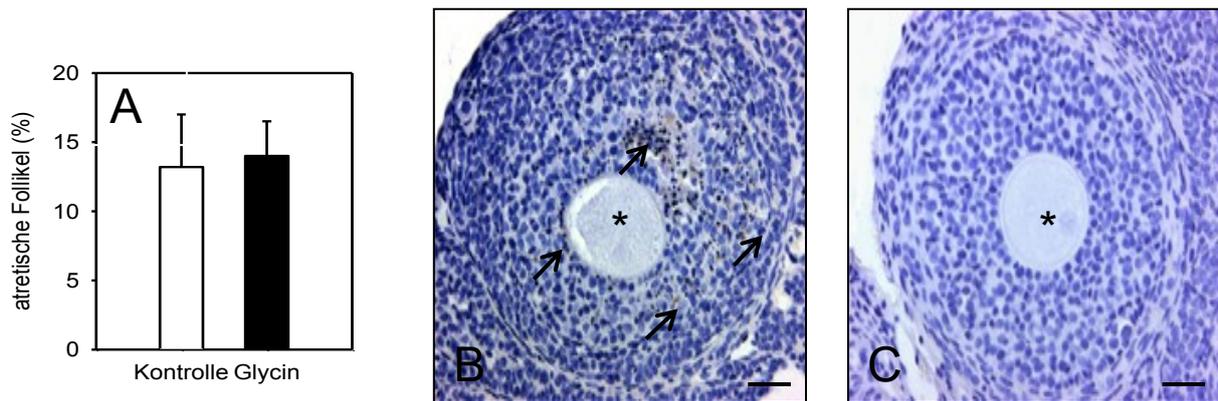


Abbildung 16: Atretische Follikel (%) (**A**) in eutopen Ovarien Glycin-behandelter Hamster (schwarzer Balken) und Kontrollhamster (weißer Balken). Mittelwerte \pm SEM. Repräsentative Darstellung eines atretischen (**B**) und eines normalen Follikels (**C**) im Ovar eines Kontrollhamsters. Die immunhistochemische Detektion von Caspase-3 zeigt viele apoptotische Granulosazellen (Pfeile), welche die Eizelle (Sternchen) des atretischen Follikels umgeben, wohingegen der normale Follikel durch ein Fehlen apoptotischer Zellen charakterisiert ist. Maßstab: B,C = 40 μ m.

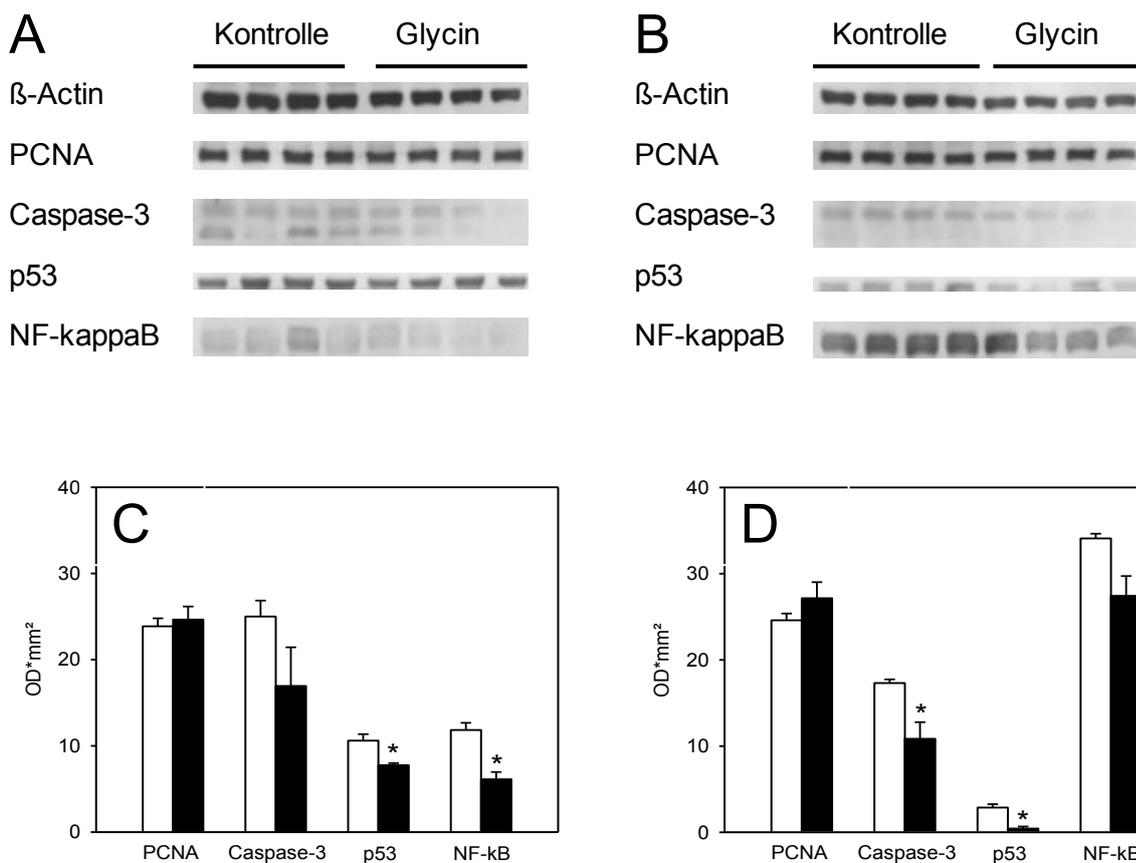


Abbildung 17: Western Blot (**A, B**) und Quantifizierung (**C, D**) der PCNA-, Caspase-3-, p53- und NF- κ B-Expression (OD*mm²) in eutopem Endometrium (**A, C**) und Ovarien (**B, D**), Glycin-behandelte Hamster (schwarze Balken) und Kontrollhamster (weiße Balken). Mittelwerte \pm SEM. * $P < 0,05$ vs. Kontrollgruppe.

6.2.5. Western Blot

Die Expression von PCNA war bei Glycin-behandelten Hamstern und Kontrollhamstern in eutopem Endometrium und Ovar vergleichbar (*Abbildung 17*). Im Gegensatz dazu war unter Glycin-Diät die Expression der Apoptose-Marker Caspase-3 und p53 signifikant reduziert. Zusätzlich war die Expression von NF- κ B vermindert (*Abbildung 17*).

6.2.6. Reproduktive Funktion

Die Glycin-behandelten Hamster und die Kontrollhamster hatten eine vergleichbare Gesamtzahl lebensfähiger Nachkommen ($7,2 \pm 1,1$ bzw. $9,7 \pm 1,5$). In beiden Gruppen lag die Zeit bis zum Wurf im Bereich von 20-25 Tagen. Weiterhin entwickelten sich die Jungen nach der Geburt in beiden Gruppen normal. Sie wiesen während der ersten 21 Tage keine signifikanten Gewichtsunterschiede auf (Glycingruppe: $2,7 \pm 0,2$ g (Tag 0); $9,4 \pm 0,8$ g (Tag 10); $22,4 \pm 3,2$ g (Tag 21); Kontrollgruppe: $3,0 \pm 0,4$ g (Tag 0); $11,2 \pm 0,8$ g (Tag 10), $29,3 \pm 3,7$ g (Tag 21)). Teratogene Veränderungen konnten nicht gefunden werden.

6.3. Genistein

6.3.1. Entwicklung der Transplantate

Nach Isolierung und Transplantation in die Rückenhautkammer wiesen die Endometriumfragmente und ovariellen Follikel in beiden Beobachtungsgruppen eine vergleichbare Größe von $0,23 \text{ mm}^2$ auf. Die Behandlung mit Genistein führte zu keiner Regression der Endometrioseherde und ovariellen Follikel. Im Vergleich zu der am Tag 0 gemessenen Größe lag am Tag 14 die Endgröße bei $103\% \pm 15\%$ bei den Endometrioseherden und $154\% \pm 17\%$ bei den ovariellen Follikeln. Dies war vergleichbar mit der Größenentwicklung in der Kontrollgruppe ($163\% \pm 23\%$ bei den Endometrioseherden und $128\% \pm 10\%$ bei den ovariellen Follikeln).

6.3.2. Mikrovaskuläres Netzwerk

In allen 3 Gruppen konnten schon am 2.Tag nach Transplantation von Endometrium-

fragmenten in die Rückenhautkammer durchblutete Mikrogefäße beobachtet werden (*Abbildung 18A, B*).

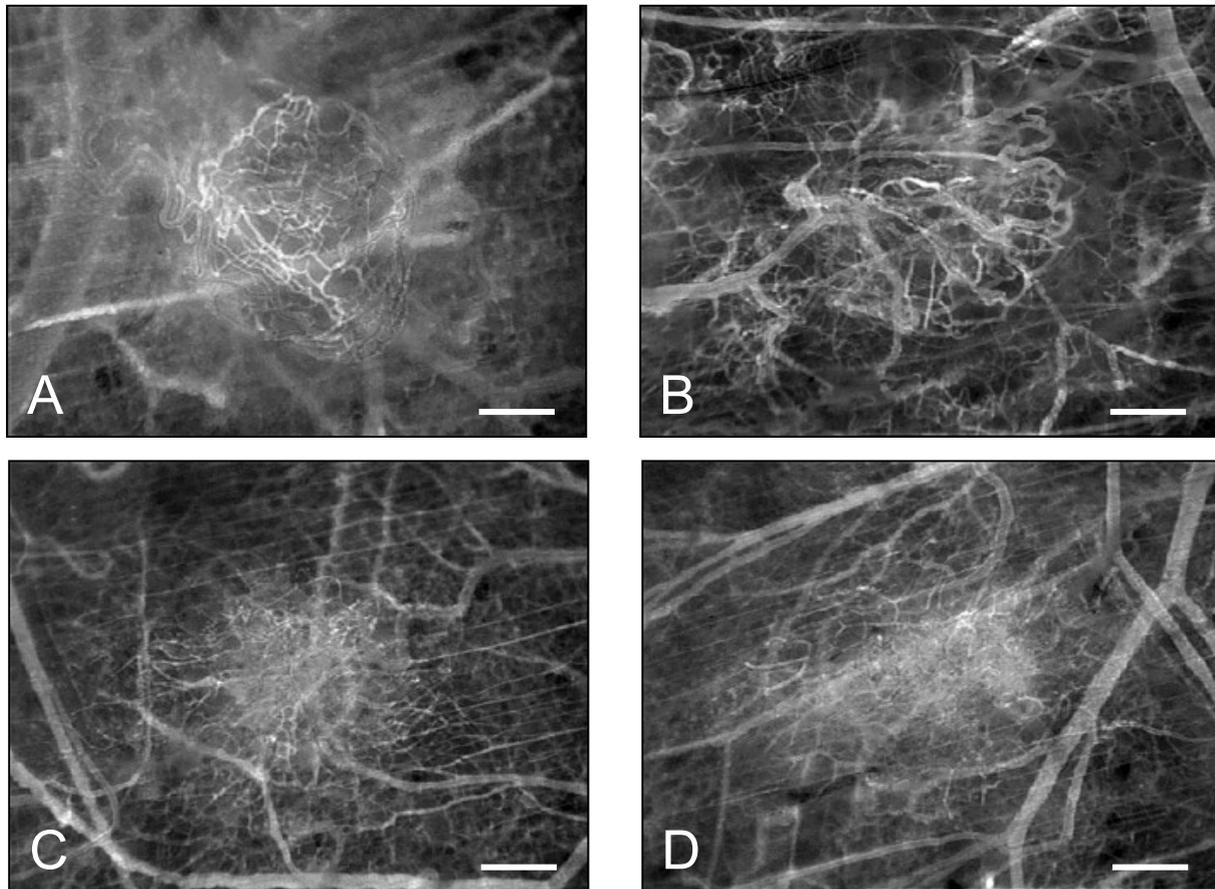


Abbildung 18: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie von Endometrioseherden (*A, B*) und ovariellen Follikeln (*C, D*) am Tag 7 nach Gewebetransplantation in die Rückenhautkammer Genistein-behandelter Hamster (50mg/kg KG) (*B, D*) und Kontrollhamster (*A, C*). Alle Transplantate weisen vollständige, neu entwickelte mikrovaskuläre Netzwerke mit einer glomerulartigen Gefäßarchitektur auf. Blau-Licht Epi-Illumination mit Kontrastverstärkung durch 5% FITC-Dextran. Maßstab: A-D = 160µm.

Interessanterweise war diese initiale Vaskularisierung in den Endometrioseherden Genistein-behandelter Hamster Dosis-abhängig reduziert. Dies zeigte sich in einer, im Vergleich zu den Hamstern der Kontrollgruppe, verminderten vaskularisierten Fläche und einer verminderten funktionellen Kapillardichte zwischen Tag 4 und Tag 7 (*Abbildung 19A, B*). Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 14 Tagen wiesen jedoch sowohl die mit Genistein-behandelten Hamster als auch die Kontrollhamster vollständig vaskularisierte Endometrioseherde mit einer funktionellen Kapillar-

dichte von ca. 300cm/cm² auf (Abbildung 19B). Durch ihr glomerulumartiges Aussehen konnten sie leicht vom umgebenden Empfängergewebe und dessen Blutgefäßen unterschieden werden (Abbildung 18A, B). Vergleichbare Ergebnisse wurden bei den ovariellen Follikeln gefunden. Die Behandlung mit Genistein resultierte verglichen mit der Kontrollgruppe in einer leicht verminderten Vaskularisierung der Follikel am Tag 2 (Abbildung 19C, D). Allerdings zeigten sich keine großen Unterschiede bezüglich der vaskularisierten Fläche und der funktionellen Kapillardichte innerhalb der Gruppen zwischen Tag 4 bis 14 (Abbildung 19C, D und Abbildung 18C, D). Dies war auch bei den Tieren der Fall, die mit einer hohen Dosis von 200mg/kg KG Genistein behandelt wurden.

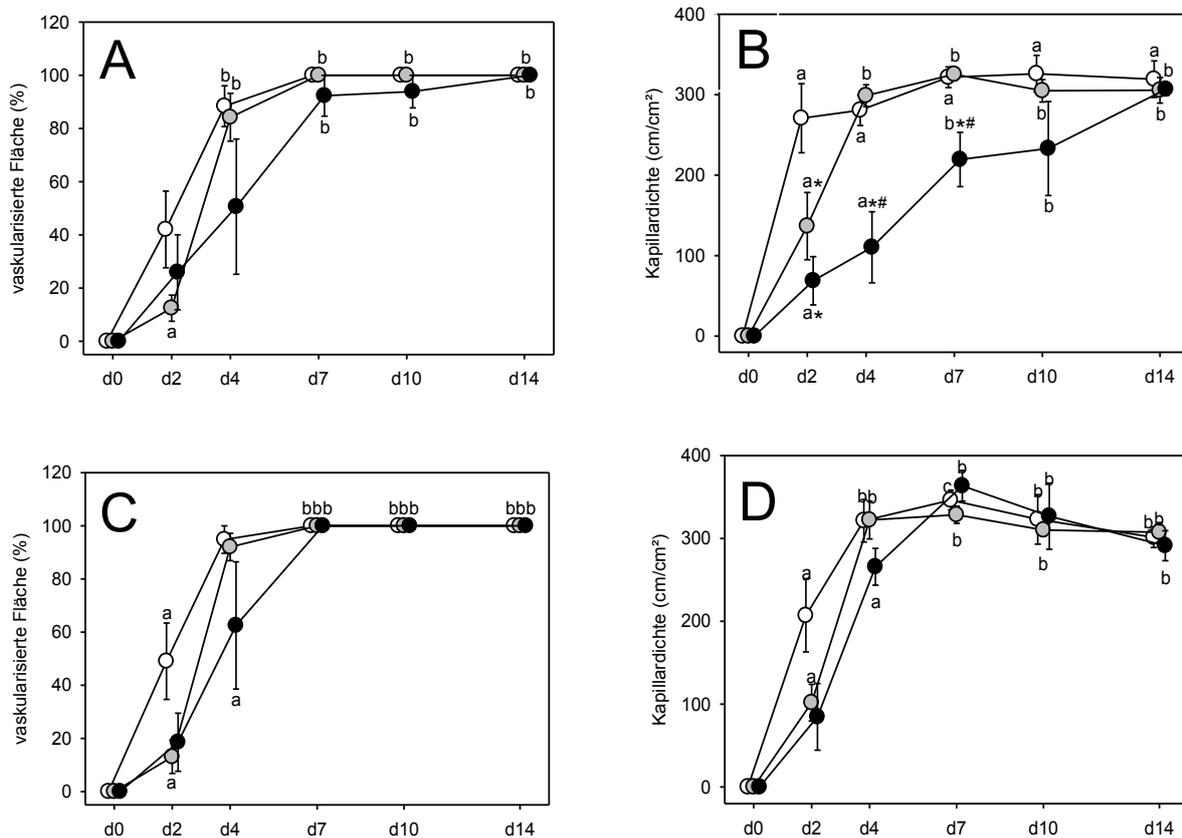


Abbildung 19: Vaskularisierte Fläche (%) (A, C) und Kapillardichte (cm/cm²) (B, D) von Endometrioseherden (A, B) und ovariellen Follikeln (C, D) in der Rückenhautkammer Genistein-behandelter Hamster (50mg/kg: graue Kreise, n=6; 200mg/kg: schwarze Kreise, n=4) und Kontrollhamster (weiße Kreise; n=6). Mittelwerte \pm SEM. ^aP<0,05 vs. Tag 0 innerhalb einer Gruppe; ^bP<0,05 vs. Tag 0 und 2 innerhalb einer Gruppe; ^cP<0,05 v Tag 0, 2 und 4 innerhalb einer Gruppe; *P<0,05 vs. Kontrollgruppe; #P< 0,05 vs. 50mg/kg Genistein.

6.3.3. Mikrohämodynamik

Die Kapillaren innerhalb der sich entwickelnden Endometrioseherde wiesen sowohl in der Kontrollgruppe als auch in Genistein-behandelten Tieren am 2. Tag nach Transplantation von Endometrium in die Rückenhautkammer Durchmesser von 12-16µm auf. An Tag 14 hatten sich diese auf 10-12µm reduziert (*Tabelle 4*). Im Verlauf des Versuches kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Blutzellgeschwindigkeit (23-45µm/s an Tag 2 und 169-198µm/s an Tag 14) und des Blutvolumenflusses (4-6pl/s an Tag 2 und 13-17pl/s an Tag 14) (*Tabelle 4*). Während des gesamten Versuchszeitraums gab es zwischen den Endometrioseherden beider Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

Endometrium	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Gefäßdurchmesser					
Genistein (50mg/kg)	13,7 ± 1,6	13,8 ± 0,5	12,5 ± 0,4	11,2 ± 0,4	10,4 ± 0,5
Genistein (200mg/kg)	16,3 ± 1,0	16,1 ± 1,0	13,7 ± 1,3	15,5 ± 2,6	12,4 ± 1,5
Kontrolle	12,4 ± 0,7	14,4 ± 1,6	12,4 ± 1,3	11,9 ± 0,9	11,0 ± 0,6
Blutzellgeschwindigkeit					
Genistein (50mg/kg)	22,8 ± 9,7	90,6 ± 30,4 ^a	173,0 ± 34,2 ^b	157,2 ± 24,3 ^b	185,5 ± 28,7 ^b
Genistein (200mg/kg)	33,5 ± 13,8	71,1 ± 37,7	146,4 ± 63,4 ^a	145,4 ± 44,6 ^a	168,5 ± 15,0 ^a
Kontrolle	44,7 ± 23,3	135,6 ± 42,7 ^a	233,4 ± 17,6 ^a	237,5 ± 30,1 ^a	197,5 ± 26,1 ^a
Blutvolumenfluss					
Genistein (50mg/kg)	3,7 ± 1,7	10,7 ± 3,7 ^a	15,9 ± 2,5 ^a	11,8 ± 1,9 ^a	13,0 ± 3,1 ^a
Genistein (200mg/kg)	5,5 ± 2,5	9,8 ± 3,9	13,0 ± 3,3	20,0 ± 1,2 ^a	16,5 ± 4,9
Kontrolle	3,5 ± 1,6	14,6 ± 3,1 ^a	21,1 ± 5,1 ^a	22,4 ± 6,6 ^a	15,5 ± 2,7 ^a
Follikel	Tag 2	Tag 4	Tag 7	Tag 10	Tag 14
Gefäßdurchmesser					
Genistein (50mg/kg)	13,8 ± 1,3	10,8 ± 0,4 ^a	10,5 ± 0,4 ^a	10,2 ± 0,4 ^{a*}	9,8 ± 0,4 ^a
Genistein (200mg/kg)	12,6 ± 1,0	12,0 ± 0,3 [*]	12,2 ± 0,6 [*]	12,4 ± 0,5 [*]	11,4 ± 0,6
Kontrolle	11,6 ± 0,8	10,0 ± 0,4	9,6 ± 0,3	8,5 ± 0,2 ^a	9,6 ± 0,4
Blutzellgeschwindigkeit					
Genistein (50mg/kg)	10,9 ± 4,7	64,8 ± 22,4	217,1 ± 29,0 ^b	201,3 ± 16,7 ^b	238,3 ± 37,4 ^b
Genistein (200mg/kg)	29,2 ± 18,7	113,8 ± 51,9	145,2 ± 52,2 ^a	132,8 ± 40,0 ^{b*}	214,5 ± 16,0 ^a
Kontrolle	8,2 ± 4,0	95,3 ± 16,3 ^a	259,0 ± 33,1 ^b	249,2 ± 16,2 ^b	198,1 ± 15,3 ^b
Blutvolumenfluss					
Genistein (50mg/kg)	1,1 ± 0,5	5,1 ± 2,0	14,7 ± 1,7 ^b	12,8 ± 1,0 ^b	14,3 ± 2,2 ^b
Genistein (200mg/kg)	2,8 ± 1,9	10,2 ± 4,8	12,1 ± 4,0	13,6 ± 5,7	16,9 ± 3,0 ^b
Kontrolle	2,8 ± 1,9	10,2 ± 4,8	12,1 ± 4,0	13,6 ± 5,7	16,9 ± 3,0 ^b

Tabelle 4: Gefäßdurchmesser (µm), Blutzellgeschwindigkeit (µm/s) und Blutvolumenfluss (pl/s) der Kapillaren in Endometrioseherden und ovariellen Follikeln in der Rückenhautkammer Genistein-behandelter Hamster und Kontrollhamster. Mittelwerte ± SEM. ^aP<0,05 innerhalb einer Gruppe; ^bP<0,05 vs. Tag 2 und Tag 4 innerhalb einer Gruppe; *P<0,05 vs. Kontrollgruppe.

Die ovariellen Follikel wiesen am 2. Tag nach Transplantation in die Rückenhautkammer Kapillardurchmesser von 12-14µm auf. An Tag 14 hatten sich diese auf 10-11µm reduziert (*Tabelle 4*). Auch im Falle der Follikel stiegen die Blutzellgeschwin-

digkeit (8-29 $\mu\text{m/s}$ an Tag 2 und 198-238 $\mu\text{m/s}$ an Tag 14) und der Blutvolumenfluss (1-3pl/s an Tag 2 und 11-17pl/s an Tag 14) kontinuierlich an. (Tabelle 4). Wiederum ergaben sich keine erkennbaren Unterschiede zwischen der Genistein-Gruppe und der Kontrollgruppe.

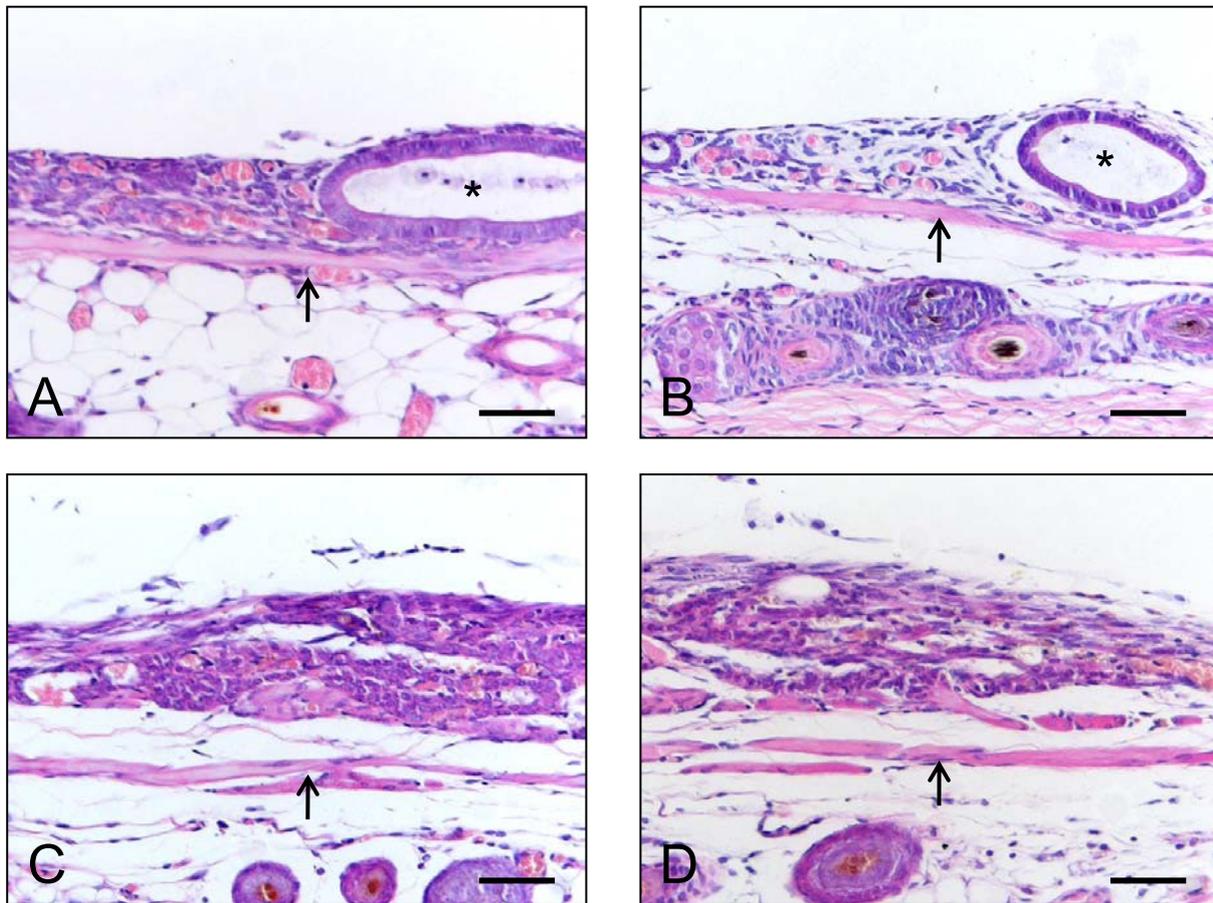


Abbildung 20: Hämatoxylin-Eosin gefärbte Schnitte von Endometrioseherden (A, B) und ovariellen Follikeln (C, D) am Tag 14 nach Gewebetransplantation auf die quergestreifte Muskulatur (Pfeile) der Rückenhautkammer Genistein-behandelter Hamster (A,C) und Kontrollhamster (B, D). In beiden Gruppen sind die Endometrioseherde durch zystenähnlich dilatierte endometriale Drüsen (Sternchen) charakterisiert, die von einem gut vaskularisierten endometrialen Stroma mit zahlreichen neu gebildeten Blutgefäßen umgeben sind (A, B). Die ovariellen Follikel beider Gruppen sind ebenfalls dicht vaskularisiert und weisen eine vergleichbare Größe auf (C, D). Maßstab: A-D = 50 μm .

6.3.4. Histologie

Die histologische Untersuchung der Rückenhautkammerpräparate an Tag 14 zeigte, dass sich die transplantierten Endometriumfragmente zu Endometrioseherden mit typischer Morphologie entwickelten. Diese wiesen zystenähnlich dilatierte Drüsen auf, die von einem gut vaskularisierten Stroma umgeben waren (Abbildung 20A, B).

Entsprechend den Ergebnissen der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie konnten auch hier zahlreiche neu entstandene Blutgefäße nachgewiesen werden. Die transplantierten ovariellen Follikel beider Gruppen bestanden aus mehreren Schichten von Granulosazellen, welche von vielen Blutgefäßen umgeben waren (*Abbildung 20C, D*). Die Histomorphologie der ovariellen Follikel unterschied sich innerhalb der beiden Gruppen nicht.

6.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden experimentellen in vivo Studie wurde das Rückenhautkammermodell am Syrischen Goldhamster zur Analyse der Angiogenese in Endometrioseherden verwendet. Weiterhin wurden auch ovarielle Follikel in die Rückenhautkammer transplantiert, um den Grad der Spezifität potentieller anti-angiogener Effekte von Nahrungsmittelkomponenten auf die Endometrioseherde zu analysieren. Die folgenden Ergebnisse über die Wirkung der Nahrungsmittelkomponenten EGCG, Glycin und Genistein auf die Vaskularisierung von Endometrioseherden und ovariellen Follikeln konnten erarbeitet werden:

1. EGCG inhibierte die Angiogenese in Endometrioseherden. Dies war durch eine signifikant reduzierte Kapillardichte der Herde im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennbar. Des Weiteren führte die Behandlung mit EGCG zu einer verminderten Durchblutung der Endometrioseherde. Dies ließ sich anhand einer reduzierten Blutzellgeschwindigkeit und eines verringerten Blutvolumenflusses zeigen. Die Vaskularisierung und die Durchblutung ovarieller Follikel wurden hingegen nicht beeinflusst. Weiterhin führte EGCG zu einer Regression der Endometrioseherde. So wiesen die Herde EGCG-behandelter Hamster im Vergleich zur Kontrollgruppe histomorphologisch ein abgeflachtes Drüsenepithel, eine verminderte Kapillardichte und eine signifikant verminderte Läsionsgröße auf. Die histologische Analyse ovarieller Follikel zeigte keine Unterschiede zwischen EGCG-behandelten Hamstern und Kontrollhamstern. Desweiteren inhibierte EGCG die VEGF-Expression in eutopem Endometrium und die E2-induzierte Aktivierung, Proliferation und VEGF

Expression endometrialer Zellen. Bei der Untersuchung des Ovars konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

2. Glycin beeinflusste nicht die Angiogenese von Endometrioseherden und ovariellen Follikeln. Die vaskularisierte Fläche, die Kapillardichte und die Durchblutung der Transplantate der Glycin-Gruppe waren mit den Transplantaten der Kontrollgruppe vergleichbar. Bei der histomorphologischen Analyse ließen sich innerhalb der beiden Gruppen ebenfalls keine Unterschiede erkennen. Zudem wiesen die Glycin-behandelten Hamster eine normale reproduktive Funktion auf. Interessanterweise inhibierte Glycin jedoch durch eine verminderte Expression von NF- κ B die Apoptose in Endometrioseherden und ovariellen Follikeln.
3. Genistein inhibierte die Angiogenese weder in Endometrioseherden noch in ovariellen Follikeln. Die Netzwerkdicke der Transplantate war mit der Dichte in der Kontrollgruppe vergleichbar. Weiterhin wurde durch die Behandlung mit Genistein die Durchblutung der Endometrioseherde und der ovariellen Follikel nicht beeinflusst. Am Tag 14 nach Transplantation in die Rückenhautkammer hatten die Transplantate beider Gruppen die typische Histomorphologie gut vaskularisierter Endometrioseherde und ovarieller Follikel ohne Zeichen von Regression.